



Dynamic Search: INPADOC/Family and Legal Status, Derwent World Patents Index3

Records for: *pn=jp 60066993*

save as alert...

save strategy only...

Output

Format: Long

Output as: Browser

display/send

Modify

refine search

back to picklist

select
all none

Records 1-2 of 2 In long Format

1. 4/34/1 (Item 1 from file: 345)

5028602

Basic Patent (No,Kind,Date): JP 60066993 A2 850417 No. of Patents: 002

PATENT FAMILY:

JAPAN (JP)

Patent (No,Kind,Date): JP 60066993 A2 850417

METHOD FOR MEASURING COMPONENT IN LIVING BODY FLUID (English)

Patent Assignee: YATORON KK

Author (Inventor): ARIMURA KUNIAKI; HAMA MICHIO; SHIBATA HIDETO

Priority (No,Kind,Date): JP 83174117 A 830922

Applic (No,Kind,Date): JP 83174117 A 830922

IPC: * C12Q-001/26; G01N-033/50

CA Abstract No: * 103(11)084140B

Derwent WPI Acc No: * C 85-130835

JAPIO Reference No: * 090196C000150

Language of Document: Japanese

Patent (No,Kind,Date): JP 93060920 B4 930903

Patent Assignee: IATRON LAB

Author (Inventor): ARIMURA KUNIAKI; HAMA MICHIO; SHIBATA HIDETO

Priority (No,Kind,Date): JP 83174117 A 830922

Applic (No,Kind,Date): JP 83174117 A 830922

IPC: * C12Q-001/32; C12Q-001/26; C12Q-001/28; C12Q-001/30

Language of Document: Japanese

Inpadoc/Fam. & Legal Stat (Dialog® File 345): (c) 2006 EPO. All rights reserved.

2. 4/34/2 (Item 1 from file: 351)

004303957

WPI Acc No: 1985-130835/ 198522

Measuring components in body fluid - using oxido-reductase,
electron carrier and colour developer after removal of interfering
substances

Patent Assignee: IATRON LABORATORIES (IATR); IATRON LAB INC (IATR)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 60066993	A	19850417	JP 83174117	A	19830922	198522 B
JP 93060920	B	19930903	JP 83174117	A	19830922	199338

Priority Applications (No Type Date): JP 83174117 A 19830922

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

JP 60066993	A		11		
-------------	---	--	----	--	--

JP 93060920	B		14	C12Q-001/32	Based on patent JP 60066993
-------------	---	--	----	-------------	-----------------------------

Abstract (Basic): JP 60066993 A

Enzyme-aided measurement of body-fluid components uses, in the detection system, an oxidoreductase, an electron carrier and a reducible colour developer. Interfering substances present in the reaction system, both endogenous and exogenous, are previously removed in the presence of the oxidoreductase and the electron carrier and in the absence of the reducible colour developer and the enzyme that directly acts upon the component being analysed.

Specifically claimed are the cases in which (a) the oxidoreductase is one which couples with NAD or NADP; (b) the electron carrier is phenazine methosulphate, (deriv.) or diaphorase; and (c) the reducible colour developer is a tetrazolium salt or a combination of oxidising metal ions (partic. ferric ions) with chelating agent.

ADVANTAGE - Accurate measurement in one step with no adverse effects of interfering substances involved.

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12Q-001/32

International Patent Class (Additional): C12Q-001/26; C12Q-001/28;

C12Q-001/30; G01N-033/50

Derwent WPI (Dialog® File 351): (c) 2006 Thomson Derwent. All rights reserved.

select
all none

Records 1-2 of 2 In long Format

Output 

Format: Output as:

Modify 

©1997-2006 Dialog, a Thomson business - Version 2.5

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 昭60-66993

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和60年(1985)4月17日

C 12 Q 1/26
G 01 N 33/50

8213-4B
Z-8305-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全11頁)

⑮ 発明の名称 生体液成分の測定方法

⑯ 特 願 昭58-174117

⑰ 出 願 昭58(1983)9月22日

⑱ 発 明 者 有 村 国 明 千葉市さつきが丘1-34-1
⑱ 発 明 者 浜 三 知 夫 市川市市川3-2-4
⑱ 発 明 者 柴 田 秀 人 四街道市千代田1-29-15
⑲ 出 願 人 株式会社 ャ ト ロ ン 東京都千代田区東神田1丁目11番4号
⑳ 代 理 人 弁理士 山下 稔 平

明 細 書

1. 発明の名称

生体液成分の測定方法

2. 特許請求の範囲

(1) 酵素法を適用しかつ検出系に酸化還元酵素、電子伝達体及び被還元性発色剤を用いて生体液中の目的成分を測定する方法において、予め、目的成分以外に反応系に因与し干渉作用を有する生体液中の内因性及び外因性の物質を、目的成分に直接作用する酵素及び被還元性発色剤の非存在下でしかも少なくとも酸化還元酵素及び電子伝達体の存在下で反応させて消去することを特徴とする生体液成分の測定方法。

(2) 酸化還元酵素は、補酵素ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド又はニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリド酸と共役する酸化還元酵素であり、該酸化還元酵素は前記ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド又はニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリド酸と対になり消去反応に用いられる特許請求の範囲第(1)項記載の生体液成分

の測定方法。

(3) 電子伝達体はフェナジンメトサルフェートもしくはその誘導体又はゾアホラーゼである特許請求の範囲第(1)項記載の生体液成分の測定方法。

(4) 被還元性発色剤はテトラゾリウム塩又は酸化型金属イオンとキレート剤との組合せである特許請求の範囲第(1)項記載の生体液成分の測定方法。

(5) 酸化型金属イオンは第二鉄イオンである特許請求の範囲第(1)項記載の生体液成分の測定方法。

3. 発明の詳細な説明

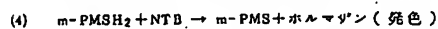
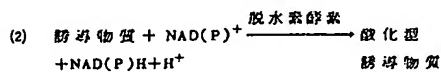
本発明は内因性又は外因性干渉物質の影響を受けることなく生体液中の成分を容易かつ正確に測定する方法に関する。

検出系に酵素法を適用して生体液中の目的成分を測定する方法においては、反応過程に産物の補酵素を必要とする酸化還元酵素による酵素反応を適用する場合は、生成する還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド又は還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリド酸を最終的に電子伝達体と被還元性発色剤との反応に導き、発色物

を比色定量するか、あるいは、遊離の補酵素を必要とせず既に酵素蛋白に補酵素をもつ酸化還元酵素による酵素反応を適用する場合は、次いで電子伝達体と被還元性発色剤との反応に導き、同様に発色物を比色定量することによって、目的成分の量を測定することが行なわれる。

血清あるいは血漿中の成分の測定に上述のような酵素法を適用して発色物を比色定量する方法は従来から数多く診断試薬に應用されている。例えば次の反応式で示す方法は、その1例で各反応が定量的に進行するので、最終のホルマザンの発色を比色定量すれば成分の測定ができる。

(1) 測定すべき成分→誘導物質



ただし、NTB：テトラゾリウム化合物の一つ、ニトロテトラゾリウムブルーを表わす。

しかしこの反応系は検体中に存在する干渉物質の影響を受け易く予めこれを除かないと正確な測定ができない。もし上記反応(1)の誘導物質と同じものが検体中に干渉物質として存在するときは、測定すべき成分からの誘導物質と共に反応(2)以下が進行し、反応(4)のホルマザンの比色定数に正の誤差を与える。このような干渉物質には、 α -アミラーゼ測定における内因性のグルコース、外因性のマルトース、GOT、GPT測定におけるL-グルタメート、トリグリセライド測定におけるグリセリン等がある。

従来は、このような場合測定すべき成分と干渉物質を一括に測定した吸光度から干渉物質のみを測定した吸光度を差し引くことにより誤差を修正した。しかしこの方法は操作を二度繰り返さなければならず煩雑でありしかも試薬の無駄も大きい。

この様な干渉物質による測定誤差は、酵素蛋白に補酵素をもつ酸化還元酵素による酵素反応を適用する場合にも同様に起るため、これら内因性及び外因性の干渉物質の作用を排除することが重要

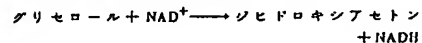
な技術的課題となっている。

本発明はこの様な実情に鑑みてなされたものであり、その目的は、内因性及び外因性干渉物質の影響を全く受けずに、生体液中の目的成分を容易かつ正確に測定する方法を提供することにある。

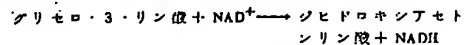
即ち、本発明の要旨は、酵素法を適用しかつ検出系に酸化還元酵素、電子伝達体及び被還元性発色剤を用いて生体液中の目的成分を測定する方法において、予め、目的成分以外に反応系に關与し干渉作用を有する生体液中の内因性及び外因性の物質を、目的成分に直接作用する酵素及び被還元性発色剤の非存在下でしかも少なくとも酸化還元酵素及び電子伝達体の存在下で反応させて消去することを特徴とする生体液成分の測定方法にある。

本発明で使用する酸化還元酵素は、反応過程に遊離の補酵素を必要とする酸化還元酵素であっても、あるいは遊離の補酵素を必要とせず既に酵素蛋白に補酵素をもつ酸化還元酵素であってもよい。以下にそれぞれの具体例を挙げる。

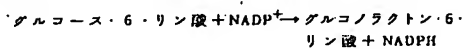
グリセロール脱水素酵素(EC 1.1.1.6)



グリセロ・3・リン酸脱水素酵素(EC 1.1.1.8)



グルコース・6・リン酸脱水素酵素(EC 1.1.1.49)



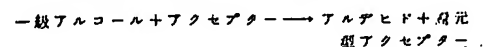
グルタミン酸脱水素酵素(EC 1.4.1.2, 1.4.1.3, 1.4.1.4)



などがあり、各々、生体液中のトリグリセリド、 α -アミラーゼ活性、トランスアミナーゼ活性の測定に有用である。

遊離の補酵素を必要としない酸化還元酵素：

アルコール脱水素酵素(EC 1.1.99.8)



グリコール酸脱水素酵素(EC 1.1.99.14)

グリコール酸+アクセプター→グリオキシル酸
+還元型アクセプター

グルコン酸2-脱水素酵素 (EC 1.1.99.3)

グルコン酸+アクセプター→2-ケトグルコン酸
+還元型アクセプター

コリン脱水素酵素 (EC 1.1.99.1)

コリン+アクセプター→ベタインアルデヒド
+還元型アクセプター

グルコシン脱水素酵素 (EC 1.5.99.1)

グルコシン+H₂O+アクセプター→グリシン+ホルムアルデヒド
+還元型アクセプター

などがあり、いずれも電子伝達体の存在下に反応が進行する。

本発明で使用する電子伝達体としては、フェナジンメトサルフェート又はメトキシフェナジンメトサルフェート等のフェナジンメトサルフェート誘導体、ジアホラーゼ、メルドラブルーなどがある。

本発明で使用する被還元性発色剤としては、3-(p-インドフェニル)-2-(p-ニトロフェ

ニル)-5-フェニル-2-水素テトラゾリウムクロライド、3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニル-2-水素テトラゾリウムプロマイド、3,3'-(3,3'-ジメトキシ-4,4'-ビフェニレン)-ビス[2-(p-ニトロフェニル)-5-フェニル-2-水素テトラゾリウムクロライド] (通称ニトロテトラゾリウムブルー)、3,3'-(3,3'-ジメトキシ-4,4'-ビフェニレン)-ビス[2,5-ジフェニル-2-水素テトラゾリウムクロライド]などのテトラゾリウム塩、及び硫酸第2鉄アンモニウム、塩化第2鉄等の第2鉄イオンとパソフェナンスロリン、パソフェナンスロリンスルホン酸ナトリウム、2-ビリジナルドキシム、3-(2-ビリジル)-5,6-ビス(4-スルフォニル)-1,2,4-トリアジンスルホン酸ナトリウム、オルトフェナンスロリン、2-ニトロソ-5-(N-プロピル-N-スルホプロピルアミノ)フェノール (通称ニトロソ-PSAP)、2-ニトロソ-5-(N-エチル-N-スルホプロピルアミノ)フェノール、などのキレート剤との組合せな

どを用いることができ、これらの組成物は使用目的によって適宜選択することができる。

本発明方法を適用する検出系として、被還元性発色剤として硫酸第2鉄アンモニウムとパソフェナンスロリンスルホン酸ナトリウムを用いた具体例を挙げる。ここで最終的に得られるキレート複合物の発色を比色定量することからなる方法は従来よりあまり例はなく例えばトリグリセリドの定量法が特開昭54-80192号に記載されており、次の反応式で示す各反応が定量的に進行するので最終のキレート複合物の発色を比色定量すれば目的成分の測定ができる。

(5) 目的成分→生成物

(6) 生成物 + NAD(P)⁺ $\xrightarrow{\text{脱水素酵素}}$ 酸化型生成物 + NAD(P)H + H⁺

(7) NAD(P)H + H⁺ + 2Fe³⁺ $\xrightarrow{\text{電子伝達体}}$ NAD(P)⁺ + 2Fe²⁺

(8) Fe²⁺ + 3 (パソフェナンスロリンスルホン酸ナトリウム) → キレート複合物 (発色)

もし、上記反応(5)の生成物と同じものが検出中に干渉物質として存在するときは、目的成分からの生成物と共に反応(6)以下が進行し反応(8)のキレート複合物の比色定量に正の誤差を与える。

α-アミラーゼの測定における内因性グルコース、外因性マルトースは

α-グルコアミラーゼ
マルトース → 2 (グルコース)

グルコース + ATP $\xrightarrow{\text{ヘキソキナーゼ}}$ グルコース・6-リン酸 + ADP

グルコース・6-リン酸 + NAD(P)⁺ $\xrightarrow{\text{グルコース・6-リン酸脱水素酵素}}$ 6-ホスホグルコン酸 + NAD(P)H

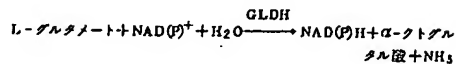
の反応を介して NAD(P)H を生じる。

また、トリグリセリド測定における内因性グリセロールは、

グリセロール + NAD(P)⁺ $\xrightarrow{\text{グリセロール脱水素酵素}}$ ジヒドロキシアセトン + NAD(P)H

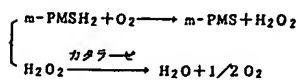
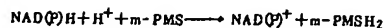
の反応を介して NAD(P)H を生じる。

GOT, GPT 測定における L-グルタミン酸は、グルタミン酸脱水素酵素 (GLDH) によって

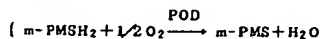


の反応を介して、同様に NAD(P)H を生じる。

これらの各々の目的成分の測定に対応した干渉物質から生ずる NAD(P)H は以下の反応により消去される。



又は



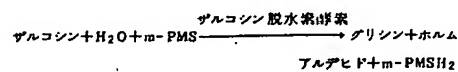
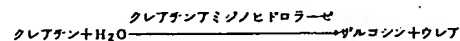
ただし O_2 : 溶解酸素

H_2O_2 : 過酸化水素

を表す。

該 NAD(P)H は NAD(P)⁺ に戻り、また m-PMSSH₂ は m-PMS に戻る。以下、カタラーゼを使用する場合は最終的に水と酸素を生ずるのみであり、また POD を使用する場合は水を生ずる。したがって、鋭く目的成分の測定の際には干渉物質の影響は全く除かれている。

すなわち、消去反応を行わせた後、炭酸第 2 鉄アンモニウムとパソフェナンスロリンスルホン酸ナトリウム及び α-アミラーゼ測定の場合は、その基質となる糖質アンプル、トリグリセリドの測定にはリパーゼ、GOT, GPT の測定では L-アスパラギン酸または L-アラニン、α-ケトグルタレートなどを各々添加すればよい。また、クレアチニンの測定の場合、内因性クレアチンは



の反応を介して m-PMS の存在下で m-PMSSH₂ を生成

する。以下、カタラーゼあるいは POD を用いることにより、上記と同様の反応が進行し、干渉物質は消去される。鋭く目的成分の測定の際にはクレアチンアミドヒドロラーゼ及び炭酸第 2 鉄アンモニウムとパソフェナンスロリンスルホン酸ナトリウムを添加することにより、正確な測定ができる。

また、前述のテトラゾリウム塩としてニトロテトラゾリウムブルーを被還元性発色剤として用いる (1)~(4) の検出系においては、測定反応の過程で干渉作用を示す内因性、外因性物質あるいはその生成物を脱水素酵素の存在下に酸化してその干渉能力を失わせると同時に NAD(P)⁺ を還元し生成する NAD(P)H を次に PMS または m-PMS の存在下に酸化し NAD(P)⁺ に戻すと同時に PMS、m-PMS を還元して PMSSH₂、m-PMSSH₂ を生ずるこのものは反応液中の溶解酸素により直に酸化され元の PMS、m-PMS に戻ると同時に過酸化水素を生成するが、この過酸化水素はカタラーゼの作用で分解されて消失する。またペルオキシダーゼ (POD) の存在下の場合には溶解酸素により酸化され元の PMS、m-PMS に

戻ると同時に水を生成する。また、遊離の糖酵素を必要としない酸化還元酵素の場合にも PMS または m-PMS を介して同様に反応が進行する。

このようにして検体中の干渉物質を後に影響を残すことなく消滅した後前述の通り成分の測定を行なうので、最終段階のホルマザン又はキレート複合物の発色は成分の量に比例するものとなり正確な比色定量ができる。なおこの場合には被還元性発色剤が存在するので最終段階の PMSSH₂、m-PMSSH₂ は溶解酸素との反応に優先して定量的にホルマザン又はキレート複合物の発色を表現する。これらのことは、その他に電子伝達体としてジアホラーゼを用いても同様にこなえ、各種成分について種々の組み合わせが可能である。

本発明の方法は上述のように、酵素反応を適用して、目的成分より順次定量的に生成する生成物を最終的に電子伝達体-被還元性発色剤を用いて測定する、体液中の α-アミラーゼの測定、トランスアミナーゼの測定、およびグリセリン脱水素酵素、またはグリセロキナーゼ-グリセロホスフ

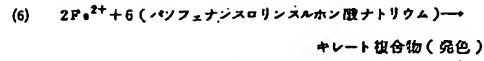
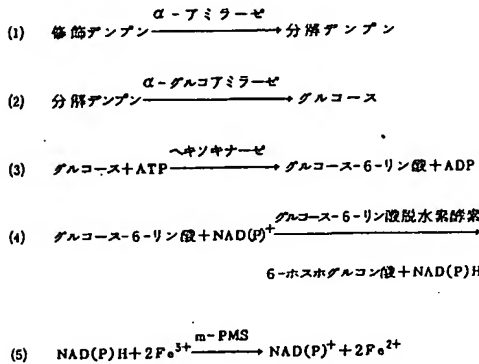
キレート脱水素酵素によるトリグリセリドの測定等に適用でき、その効果は顕著である。

次に本発明の方法およびその効果について実施例、試験例によりさらに詳細に説明する。

なお消去反応の実施を前処理と表現する。

実施例1 α-アミラーゼの測定

体液中のα-アミラーゼは次の反応系により測定できる：



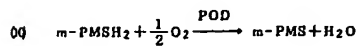
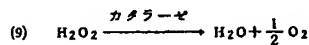
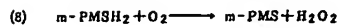
ただし、ATP：アデノシン三リン酸

ADP：アデノシン二リン酸

を要す。

反応(6)で生成するキレート複合物の吸光度を測定し、その結果から、α-アミラーゼの活性値を計算する。もし生体液中に内因性グルコース、または、最近産生に輸液として用いられているマルトースが干渉物質として存在するときは反応(3)また、反応(2)、(3)により、次いで反応(4)(5)(6)によりキレート複合物が生成するため、α-アミラーゼの測定値に正の誤差を与える。

本発明においては、始めに反応(1)の分解デンプンを加えることなく反応(2)以下を行なわせ内因性グルコース、およびマルトースは反応(2)、(3)、(4)により6-ホスホグルコン酸とし、これを除去する。次いで反応(5)(6)は鉄キレート剤が存在しないので起らず次の別反応が進行する。



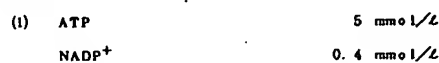
ただし、O₂：溶解酸素

H₂O₂：過酸化水素

を要す。

反応(7)～(10)により干渉物質から生ずるNAD(P)HはNAD(P)⁺に戻り、またm-PMH₂はm-PMSに戻り、カタラーゼを使用する場合は最終的には水と酸素を生ずるのみであり、またPODを使用する場合は水を生ずる。したがって、続く成分の測定の誤差は干渉物質の影響は全く除かれている。すなわち前処理をした後、反応(1)より反応(6)までを実施すればα-アミラーゼの正確な測定ができる。

1. 試薬



m-PMS	30 μmol/L
MgCl ₂	20 mmol/L
ヘキソキナーゼ	600 u/L
グルコース-6-リン酸	500 u/L
脱水素酵素	
グルコアミラーゼ	4800 u/L
POD	10000 u/L
牛アルブミン	0.1%
を含む100 mmol/L	pH 8.2
コハク酸緩衝液	

(2) バソフェナジスロリンスルホン酸ナトリウム	10 mmol/L
ソディウム・スターチ・グリコレート	7.2 mg/ml
を含む200 mmol/L トリエタノールアミン緩衝液	pH 7.0
(3) 塩酸第二鉄アンモニウム	1.25 mmol/L
クエン酸	5 mmol/L
を含む50 mmol/L トリエタノール緩衝液	pH 6.6
(4) シュウ酸	50 mmol/L
EDTA-OH	4 mmol/L

を含む 0.1 mol/L トリエタノールアミン
緩衝液 pH 8.6

2. 操作法

試薬 (1) 2 ml に血清検体 20 μ L を加え 37℃、5 分間保温後、試薬 (2) (3) を等量混和したもの 1 ml を加えさらに 37℃、5 分間保温後に試薬 (4) 1 ml を加えて、反応を停止した後、波長 535 nm で吸光度を測定する。別に α -アミラーゼ活性既知の検体を上記と同様に操作し、検量線を作り、この検量線より血清検体の α -アミラーゼ活性を求める。

試験例 1

(1) α -アミラーゼ測定におけるグルコースの影響

血清検体にグルコースを 200, 400, 600, 800, 1000 mg/dl の濃度で添加した検体について実施例 1 より吸光度を測定した。別に同じ検体について本発明の前処理を行わない方法、すなわち、試薬 (1) 2 ml と試薬 (2) (3) を等量混和したもの 1 ml の混合試薬に検体 20 μ L を加えて、37℃、5 分間保温後に試薬 (4) 1 ml を加えて反応を停止し

特開昭 60-66993 (6)

た後、吸光度を測定した。その結果は、次の表に示す。

前処理	0	200	400	600	800	1000
無	0.500	1.135	1.846	2.485	2.882	3.090
有	0.183	0.188	0.183	0.181	0.192	0.184

上の表が示すように、内因性グルコースに対する前処理を行わない場合は、グルコースにより、かなりの影響を受け、結果として、 α -アミラーゼ活性を測定しているとはいえない。本発明によれば、1000 mg/dl の高濃度のグルコースによっても影響を受けずに α -アミラーゼ活性を正確に測定できる。

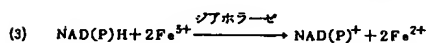
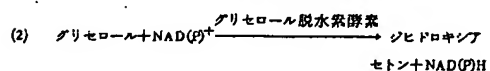
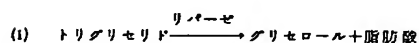
(2) 本発明方法の α -アミラーゼ活性濃度と吸光度との関係

実施例 1 の方法により、 α -アミラーゼ活性の濃度系列について吸光度を測定した結果を第 1 図に示す。

この図が示すように α -アミラーゼ活性の濃度と吸光度とは、直線関係を示し、正しく、 α -アミラーゼ活性を測定できることが分る。

実施例 2 トリグリセリドの測定

体液中のトリグリセリドは次の反応系により測定できる。



上述の反応で生成するキレート複合物の吸光度を測定しその結果からトリグリセリド値を算出する。

生体液中に内因性グリセロールあるいは透析患者に用いられるグリセロールが干渉物質として存

在するときは測定値に正の誤差を与える。

本発明においては、始めにグリセロールをグリセロール脱水素酵素と NAD(P)^+ の反応により、ジヒドロキシアセトンにし、これを除去する。ついで生成した NAD(P)H の除去はジアホラーゼとペルオキシダーゼにより前述の反応と同様に行なわれ干渉物質であるグリセロールは消去される。

次いでリパーゼおよび鉄キレート剤を含む試薬を添加し、トリグリセリドを正確に測定することができる。

1. 試薬

- (1) NAD^+ 40 mmol/L
ジアホラーゼ 4000 u/L
ペルオキシダーゼ 800 u/L
グリセロール脱水素酵素 20000 u/L
牛アルブミン 1 g/L
を含む 100 mmol/L トリエタノールアミン緩衝液 pH 7.8
- (2) Nitroso PSAP 10 mmol/L

を含む100 mmol/L トリエタノールアミン緩衝液

pH 7.8

- (3) シュウ酸 20 mmol/L
 硫酸第二鉄アンモニウム 10 mmol/L
 リパーゼ 4×10^5 u/L

を含む100 mmol/L トリエタノールアミン緩衝液

pH 7.2

- (4) EDTA 4 mmol/L

を含む100 mmol/L トリエタノールアミン緩衝液

pH 8.6

2. 操作法

試薬(1) 500 μ Lに血清検体5 μ Lを加え、37℃で10分間保温後に試薬(2)、(3)各々250 μ Lを加えさらに37℃、20分間保温後に試薬(4)4 μ Lを加えて反応を停止した後、波長750 nmで吸光度を測定する。別に、グリセロール既知の検体を上記と同様に操作し、検量線を作り、この検量線より血清検体のトリグリセリド量を求める。

試験例2

- (1) トリグリセリド測定におけるグリセロール

の影響

血清検体にグリセロールを20、40、60、80、100 mg/dlの濃度で添加した検体について、実施例2により吸光度を測定した。別に同じ検体について、本発明の前処理を行わない方法、即ち、試薬(1)500 μ Lと試薬(2)(3)各々250 μ Lの混合試薬に検体5 μ Lを加えて、37℃20分間保温後に試薬(4)4 μ Lを加えて反応停止した後、吸光度を測定した。その結果は次の表に示す。

グリセロール mg/dl 前処理	0	20	40	60	80	100
無	0.136	0.312	0.488	0.664	0.840	1.016
有	0.130	0.135	0.133	0.131	0.139	0.130

上の表が示すように、~~前処理~~によるグリセロール消去の有無はトリグリセリド測定に大きな影響を与える。

- (2) 本発明方法のトリグリセリド濃度と吸光度との関係

実施例2の方法により、トリグリセリドの濃度系列について吸光度を測定した結果を第2図に示す。この図が示すように、トリグリセリド濃度と吸光度とは直線関係を示し、正しくトリグリセリド濃度を測定できることが分る。

実施例3 グルタミン酸オキサロアセテート転移酵素(GOT)およびグルタミン酸ピルベート転移酵素(GPT)の測定

体液中のGOT、GPTはグルタミン酸脱水素酵素(GLDH)を用い次の反応系により測定できる。

1. α -ケトグルタレート + L-アスパラギン酸 $\xrightarrow{\text{GOT}}$ L-グルタミン酸 + オキサロ酢酸
2. α -ケトグルタレート + L-アラニン $\xrightarrow{\text{GPT}}$ L-グルタミン酸 + ピルビン酸
3. L-グルタミン酸 + NAD(P)⁺ + H₂O $\xrightarrow{\text{GLDH}}$ NAD(P)H + α -ケトグルタレート + NH₃
4. NAD(P)H + NTB $\xrightarrow{\text{m-PMS 又は シアホラーゼ}}$ NAD(P) + ホルマゼン

上述の反応で生成するホルマゼンの吸光度を測定し、その結果からGOT、GPTの活性値を計算する。

血清あるいは血漿中に干渉物質として存在するL-グルタメートはGLDHと反応し、NAD(P)Hを生成するため、GOTあるいはGPTの測定値に正の偏差を与える。

本発明においては始めに内因性L-グルタメートをGLDHとNAD(P)⁺の反応により、 α -ケトグルタレートに転化し、これを除去する。次いで、生成したNAD(P)Hの除去については実施例1で述べたのと全く同様に行なわれ干渉物質であるL-グルタメートは消滅される。

次いで、L-アスパラギン酸またはL-アラニン、 α -ケトグルタレートおよびNTBを含む試薬を添加し、トランスアミナーゼ(GOT、GPT)活性を正確に測定することができる。

1. 試薬

- (1) カタラーゼ 10000 u/L
 グルタメート 40000 u/L

- 脱水炭酸酵素
- NAD⁺ 46 mmol/L
- m-PMS 100 μmol/L 又は ジアホラーゼ 4000 u/L
- を含む 100 mmol/L pH 7.8
- リン酸緩衝液
- (2) GPT 測定用
- D L - アラニン 800 mmol/L
- α - ケトグルタレート 11 mmol/L
- NTB 1.0 mmol/L
- を含む 100 mmol/L pH 7.8
- リン酸緩衝液
- GOT 測定用
- L - アスパラギン酸 400 mmol/L
- α - ケトグルタレート 16 mmol/L
- NTB 1.0 mmol/L
- を含む 100 mmol/L pH 7.8
- リン酸緩衝液
- (3) トリトン X - 100 0.1 % を含む 0.1 N-HCl 溶液

2. 操作法

試薬(1) 250 μL に血清検体 20 μL を加え、37℃、10分間保温後に、試薬(2) 250 μL を加え、さらに37℃、30分間保温後に試薬(3) 3 μL を加えて反応を停止した後、波長560 nmで吸光度を測定する。

別に、GOT、GPT 活性既知の検体を上記と同様に操作し、検量線を作り、この検量線より、血清検体の GOT、GPT 活性を求める。

試験例 5

(1) GOT、GPT 測定における L - グルタメートの影響

血清検体に L - グルタメートを 20, 40, 60, 80, 100 μg/μL の濃度で添加した検体について、実施例 2 により、吸光度を測定した。別に同じ検体について、本発明の前処理を行わない方法、即ち試薬(1) 250 μL と試薬(2) 250 μL の混合試薬に検体 20 μL を加えて、37℃、30分間保温後に試薬(3) 3 μL を加えて反応停止した後、吸光度を測定した。その結果は、次の表に示す。

	L-グルタメート μg/μL	前処理					
		0	20	40	60	80	100
m-PMS	無	0.060	0.073	0.084	0.105	0.124	0.150
	有	0.042	0.040	0.041	0.045	0.044	0.042
ジアホラーゼ	無	0.061	0.073	0.086	0.101	0.123	0.150
	有	0.041	0.040	0.042	0.046	0.043	0.042

上の表が示すように、内因性 L - グルタメートに対する前処理を行わない場合は、L - グルタメートにより、かなりの影響を受け、結果として、GOT、GPT 活性を測定しているとはいえない。本発明によれば、100 μg/μL の高濃度の L - グルタメートによっても影響を受けずに、GOT、GPT 活性を正確に測定できる。

(2) 本発明方法の GOT、GPT 活性濃度と吸光度との関係

実施例 3 の方法により、GOT、GPT 活性の濃度

系列について吸光度を測定した結果を図 3 に示す。

この図が示すように、GOT、GPT 活性の濃度と吸光度とは、直線関係を示し、正しく GOT、GPT 活性を測定できることが分った。

実施例 4 α - アミラーゼの測定

体液中の α - アミラーゼは次の反応系により測定できる：

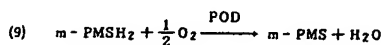
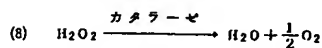
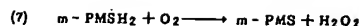
- (1) 糖筋ゲンブレン $\xrightarrow{\alpha\text{-アミラーゼ}}$ 分解ゲンブレン
- (2) 分解ゲンブレン $\xrightarrow{\alpha\text{-グルコアミラーゼ}}$ グルコース
- (3) グルコース + ATP $\xrightarrow{\text{ヘキソキナーゼ}}$ グルコース-6-リン酸 + ADP
- (4) グルコース-6-リン酸 + NAD(P)⁺ $\xrightarrow{\text{グルコース-6-リン酸脱水炭酸酵素}}$ 6-ホスホグルコン酸 + NAD(P)H
- (5) NAD(P)H + NTB $\xrightarrow{\text{m-PMS 又は ジアホラーゼ}}$ NAD(P)⁺ + イオロゲン

ただし、ATP：アデノシン三リン酸
ADP：アデノシン二リン酸
NTB：ニトロテトラゾリウムブルー
(テトラゾリウム化合物)

を要す。

反応(5)で生成するホルマザンの吸光度を測定し、その結果から、 α -アミラーゼの活性値を計算する。もし生体液中に内因性グルコース、または、最近盛んに輸液として用いられているマルトースが干渉物質として存在するときは反応(3)また、反応2、(3)により、次いで反応(4)、(5)によりホルマザンが生成するため、 α -アミラーゼの測定値に正の誤差を与える。

本発明においては、始めに反応(1)の修飾アンパンを加えることなく反応(2)以下を行なわせ内因性グルコース、およびマルトースは反応(2)、(3)、(4)により6-ホスホグルコン酸とし、これを除去する。次いで反応(5)はNTBが存在しないので起らず次の別反応が進行する。

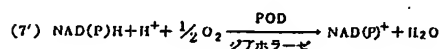
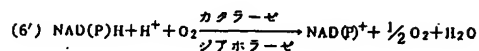


ただし、 O_2 ：溶解酸素

H_2O_2 ：過酸化水素

を要す。

又は、



反応(6)~(9)又は(6')及び(7')により干渉物質から生ずるNAD(P)HはNAD(P)⁺に戻り、カタラーゼを使用する場合は最終的には水と酸素を生ずるのみであり、またPODを使用する場合は水を生ずる。したがって、該成分の測定の際には干渉物質の影

響は全く除かれている。すなわち前処理をした後、反応(1)より反応(5)までを実施すれば α -アミラーゼの正確な測定ができる。

1. 試薬

(1) ATP	5 mmol/L
NADP ⁺	0.4 mmol/L
m-PMS 30 μ mol/L又はジアホラーゼ	2000 u/L
MgCl ₂	20 mmol/L
ヘキソキナーゼ	600 u/L
グルコース-6-リン酸	500 u/L
脱水素酵素	
グルコアミラーゼ	4800 u/L
POD	10000 u/L
牛アルブミン	0.1 %
を含む100 mmol/L	pH 8.2

コハク酸緩衝液

(2) NTB	3 mmol/L
トリトンX-100	1 %
ソジウム・スターチ・グリコレート	7.2 mg/ml
を含む40 mmol/L	pH 6.4

コンク酸緩衝液

(3) トリトンX-100	0.33 %
を含む0.6 NHCL溶液	

2. 操作法

試薬(1) 2 mlに血清検体20 μ Lを加え37℃、5分間保温後、試薬(2) 1 mlを加え、さらに37℃、5分間保温後に試薬(3) 1 mlを加えて、反応を停止した後、波長600 nmで吸光度を測定する。別に α -アミラーゼ活性既知の検体を上記と同様に操作し、検量線を作り、この検量線より血清検体の α -アミラーゼ活性を求める。

試験例4

(1) α -アミラーゼ測定におけるグルコースの影響

血清検体にグルコースを200, 400, 600, 800, 1000 mg/dlの濃度で添加した検体について実施例1により吸光度を測定した。別に同じ検体について本発明の前処理を行わない方法、すなわち、試薬(1) 2 mlと試薬(2) 1 mlの混合試薬に検体20 μ Lを加えて、37℃、5分間保温後に試薬

(3) 1 mlを加えて反応を停止した後、吸光度を測定した。その結果は、次の表に示す。

	前処理	グルコース					
		0	200	400	600	800	1000
MIPMS	無	0.410	0.930	1.513	2.037	2.362	2.533
	有	0.150	0.154	0.150	0.148	0.157	0.151
ジフホラーゼ	無	0.411	0.932	1.508	2.035	2.370	2.540
	有	0.149	0.155	0.152	0.148	0.151	0.157

上の表が示すように、内因性グルコースに対する前処理を行わない場合は、グルコースにより、かなりの影響を受け、結果として、 α -アミラーゼ活性を測定しているとはいえない。本発明によれば、1000 mg/mlの高濃度のグルコースによっても影響を受けずに α -アミラーゼ活性を正確に測定できる。

(2) 本発明方法の α -アミラーゼ活性濃度と吸光度との関係

実施例4の方法により、 α -アミラーゼ活性の濃度系列について吸光度を測定した結果を第4図に示す。

この図が示すように α -アミラーゼ活性の濃度と吸光度とは、直線関係を示し、正しく、 α -アミラーゼ活性を測定できることが分る。

以上述べた通り本発明方法は簡単な方法で検体中の干渉性物質を除去し試薬の無駄な使用もなく正確な測定を可能にした点で極めて有用なものである。

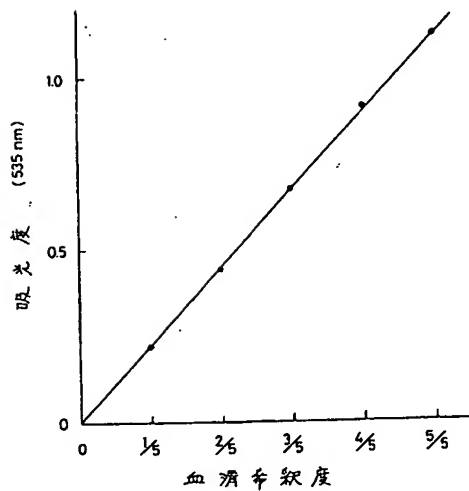
4. 図面の簡単な説明

第1図乃至第4図の縦軸は吸光度を示し、横軸は血清の希釈度を示す。

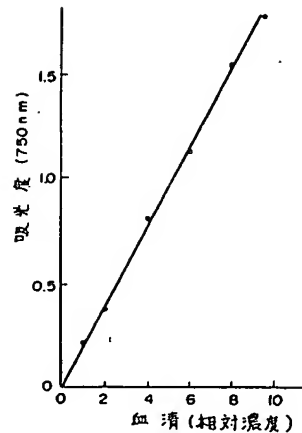
第1図●印は血清中の α -アミラーゼ活性を、第2図●印はトリグリセリド濃度を、第3図の○印はGOT活性を、△印はGPT活性を示す。

また、第3図○印は、血清中の α -アミラーゼ活性を、第2図の○印はGOT活性を、△印はGPT活性を、第4図○印は、 α -アミラーゼ活性を示す。

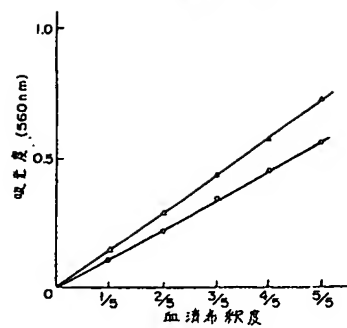
第1図



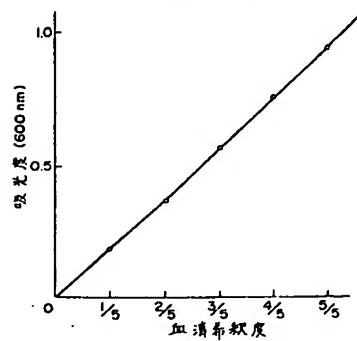
第2図



第 3 图



第 4 图



10/764,455

PTO 2006-4775

JP19850407A
60066993

METHOD FOR MEASURING COMPONENTS IN BODY FLUIDS
[Seitai-eki seibun no sokutei hoho]

Kuniaki Arimura, et al.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
Washington, D.C. June 2006

Translated by: FLS, Inc.

PUBLICATION COUNTRY	(19):	JP
DOCUMENT NUMBER	(11):	60066993
DOCUMENT KIND	(12):	A
PUBLICATION DATE	(43):	19850417
PUBLICATION DATE	(45):	
APPLICATION NUMBER	(21):	58174117
APPLICATION DATE	(22):	19830922
ADDITION TO	(61):	
INTERNATIONAL CLASSIFICATION	(51):	C12Q 1/26; G01N 33/50
DOMESTIC CLASSIFICATION	(52):	
PRIORITY COUNTRY	(33):	
PRIORITY NUMBER	(31):	
PRIORITY DATE	(32):	
INVENTOR	(72):	ARIMURA, KUNIAKI; HAMA, MICHIO; SHIBATA, HIDETO
APPLICANT	(71):	IATRON LABORATORIES
TITLE	(54):	METHOD FOR MEASURING COMPONENTS IN BODY FLUIDS
FOREIGN TITLE	[54A]:	SEITAI-EKI SEIBUN NO SOKUTEI HOHO

1. TITLE OF THE INVENTION

METHOD FOR MEASURING COMPONENTS IN BODY FLUIDS

2. CLAIMS

(1) A method for measuring components in body fluids, being a method for measuring a target component in a body fluid applying an enzyme method using an oxidoreductase, an electron carrier, and a reducible colorant in a detection system, characterized by eliminating intrinsic and extrinsic substances in a body fluid other than the target component which participate in the reaction system with an interfering effect by reacting beforehand in the absence of enzymes directly reacting with the target substance and the reducible colorant and in the presence of at least the oxidoreductase and the electron carrier.

(2) A method for measuring components in body fluids according to claim (1), characterized by the oxidoreductase being an oxidoreductase which couples with the coenzyme nicotinamide adenine nucleotide or nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, and using said oxidoreductase in an elimination reaction as a counter to nicotinamide adenine nucleotide or nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.

(3) A method for measuring components in body fluids according to

*Numbers in the margin indicate pagination in the foreign text.

claim (1), characterized by the electron carrier being phenazine methosulfate or a derivative of same, or diaphorase.

(4) A method for measuring components in body fluids according to claim (1), characterized by the reducible colorant being a tetrazolium salt or a combination of oxidizing metallic ions and a chelating agent.

(5) A method for measuring components in body fluids according to claim (4), characterized by the oxidizing metallic ions being ferric ions.

3. DETAILED EXPLANATION OF THE INVENTION

The present invention pertains to a method for easily and accurately measuring components in a body fluid unaffected by intrinsic or extrinsic interfering substances.

When applying an enzyme reaction by an oxidoreductase requiring a coenzyme freed in the reaction process in a method for measuring a target component in a body fluid applying an enzyme method in a detection system, the target component is measured by finally reacting the resulting reducible nicotinamide adenine nucleotide or reducible nicotinamide adenine dinucleotide phosphate with an electron carrier and a reducible colorant, then assaying the colored matter by colorimetry. When applying an enzyme reaction by an oxidoreductase which does not require a freed coenzyme, but already has a coenzyme, the target component is measured by reacting with an electron carrier and a reducible colorant, then assaying the colored

/530

matter by colorimetry.

Colorimetric assay of a colored matter by applying an enzyme method as discussed above to measuring components in blood or serum has often been applied in prior art to diagnostic reagents. The method indicated by the following reaction formulae, for example, is an example in which each reaction proceeds quantitatively, allowing a component to be measured by assaying the color of the final formazan by colorimetry.

(1) Target component \longrightarrow derived substance

(2) Derived substance + NAD(P)^+ $\xrightarrow{\text{dehydrogenase}}$ oxidizable derived substance + $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$

(3) $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$ + m-PMS \longrightarrow NAD(P)^+ + m-PMSH₂

(4) m-PMSH₂ + NTS \longrightarrow m-PMS + (colored) formazan

where NTB indicates nitrotetrazolium blue, which is a tetrazolium compound.

This reaction system, however, is easily affected by interfering substances in a specimen, which can prevent accurate measurement if not removed beforehand. If a specimen contains an interfering substance which is the same as the derived substance in this reaction (1), this interfering substance reacts together with the derived substance from the target component starting with the reaction (2), causing an error in the colorimetry of formazan in the reaction (4). Examples of such interfering substances are intrinsic glucose and

extrinsic maltose when measuring α -amylase, and L-glutamine and triglycerides when measuring GOT and GPT.

Prior art has corrected the error in such a case by subtracting the absorptance measured for the interfering substances alone from the total absorptance measured for all of the target substance and the interfering substances. This method, however, requires carrying out operations twice, which is both a nuisance and greatly wastes reagents.

Such interfering substances cause measurement error in the same way when applying oxidation by an oxidoreductase having a coenzyme in its enzyme protein. Hence, eliminating the effect of these intrinsic and extrinsic interfering substances is an important technical issue.

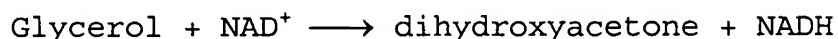
The present invention was designed upon reflecting on these circumstances. Its purpose is to provide a method for easily and accurately measuring an intended component in a body fluid completely unaffected by intrinsic or extrinsic interfering substances.

Specifically, the essence of the present invention is a method for measuring components in body fluids, which is a method for measuring a target component in a body fluid applying an enzyme method using an oxidoreductase, an electron carrier, and a reducible colorant in a detection system, characterized by eliminating intrinsic and extrinsic substances in a body fluid other than the target component which participate in the reaction system with an interfering effect by reacting beforehand in the absence of enzymes

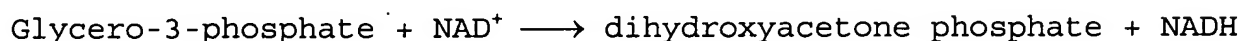
directly reacting with the target substance and the reducible colorant and in the presence of at least the oxidoreductase and the electron carrier.

The oxidoreductase used in the present invention may be either an oxidoreductase requiring a coenzyme freed in the reaction process, or an oxidoreductase which does not require a freed coenzyme, but already has a coenzyme. Next, specific examples will be cited.

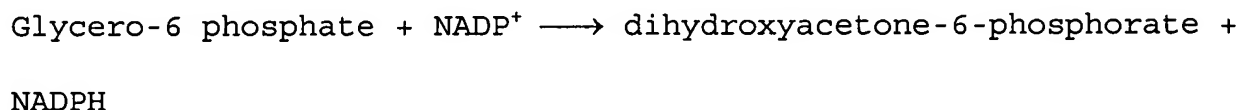
Glycerol dehydrogenase (EC 1.1.1.6)



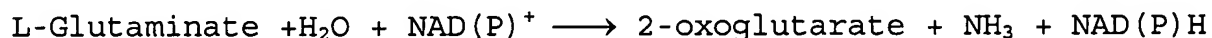
Glycero-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.8)



Glycero-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49)



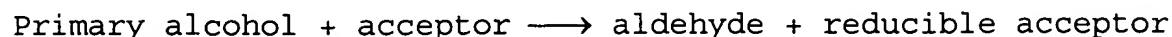
Glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.2.1.4.1.3.1.4.1.4)



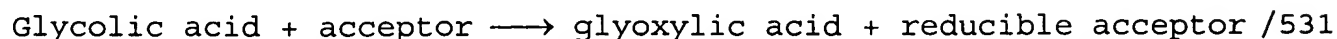
and others. All of these are useful for measuring triglycerides, α -amylase activity, or transaminase activity.

Oxidoreductases which do not require freed coenzymes:

Alcohol dehydrogenase (EC 1.1.99.8)



Glycolate dehydrogenase (EC 1.1.99.14)



Gluconate dehydrogenase (EC 1.1.99.3)

Gluconic acid + acceptor \longrightarrow 2-ketogluconic acid + reducible acceptor

Choline dehydrogenase (EC 1.1.99.1)

Choline + acceptor \longrightarrow betaine aldehyde + reducible acceptor

Glucosin dehydrogenase (EC 1.5.99.1)

Glucosin + H₂O + acceptor \longrightarrow glycine + formaldehyde + reducible acceptor

and others. All of these react in the presence of an electron carrier.

Electron carriers used in the present invention include phenazine methosulfate, phenazine methosulfate derivatives such as methoxyphenazine methosulfate, diaphorase, and Meldra blue.

Examples of reducible colorants used in the present invention include tetrazolium salts such as (p-indophenyl)-2-(p-nitrophenyl)-5-phenyl-2H tetrazolium chloride, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium chloride, 3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-biphenylene)-bis[2-(p-nitrophenyl)-5-phenyl-2H tetrazolium chloride] (common name: nitrotetrazolium blue), or 3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-biphenylene)-bis(2,5-biphenyl-2H tetrazolium chloride, and combinations of ferric ions such as ferric ammonium sulfate or ferric chloride and chelating agents such as bathophenanthroline, bathophenanthroline sodium sulfonate, 2-pyridyl aldoxime, 3-(2-

pyridyl)-5,6-bis(4-sulfonyl)-1,2,4-triazine sodium sulfonate, orthophenanthroline, 2-nitroso-5-(N-propyl-N-sulfopropylamino)phenyl (common name: nitroso-PSAP), or 2-nitroso-5-(N-ethyl-N-sulfopropylamino)phenol. These compositions can be suitably selected according to the application.

A specific example of a detection system to which the method of the present invention may be applied is a system using ferric ammonium sulfonate and bathophenanthroline sodium sulfonate as reducible colorants. Examples of methods comprising colorimetric assay of the coloration of the final chelate compound produced by such a system are few in prior art; for example, the method described in Japan Kokai Patent Publication S54-80192. The reactions indicated by the following reaction formulae progress quantitatively, allowing a component to be measured by assaying the color of the final chelate product by colorimetry.

(5) Target component \longrightarrow product substance

(6) Product substance + NAD(P)^+ $\xrightarrow{\text{dehydrogenase}}$ oxidizable product substance + $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$

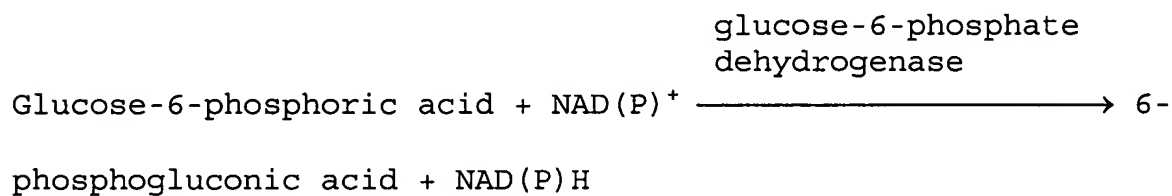
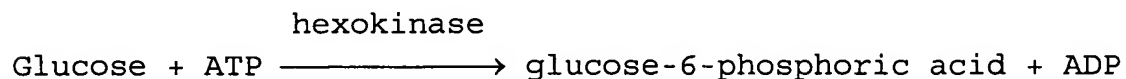
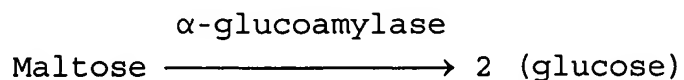
(7) $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$ + 2-Fe^{3+} $\xrightarrow{\text{electron carrier}}$ NAD(P)^+ + 2-Fe^{2+}

(8) Fe^{2+} + 3(bathophenanthroline sodium sulfonate) \longrightarrow (colored) chelate compound

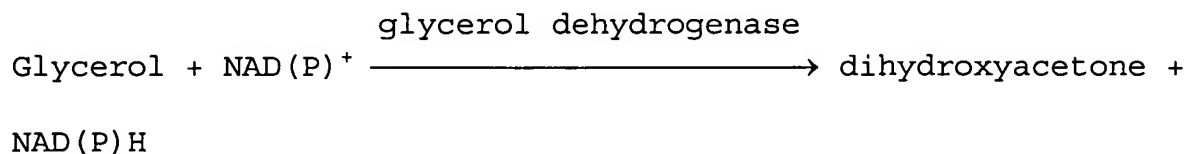
If a specimen contains an interfering substance which is the

same as the product substance of this reaction (5), this interfering substance reacts together with the product substance from the target component starting with the reaction (6), causing an error in the colorimetry of formazan in the reaction (8).

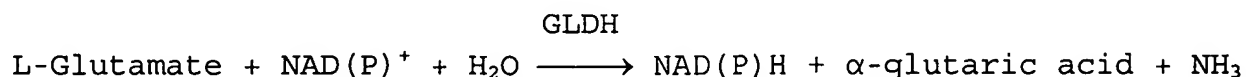
When measuring α -amylase, intrinsic glucose and extrinsic maltose produce NAD(P)H through the following reactions.



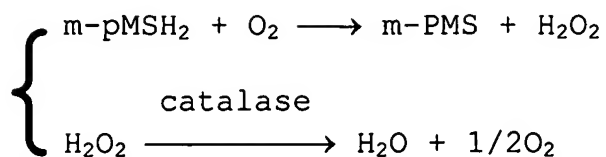
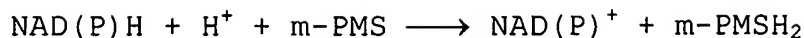
When measuring triglycerides, intrinsic glycerol produces NAD(P)H through the following reaction.



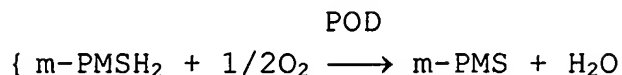
When measuring GOT and GPT, L-glutamate is reacted by glutamate dehydrogenase (GLDH) to likewise produce NAD(P)H through the following reaction.



The following reactions eliminate the NAD(P)H produced by these interfering substances when measuring these target components.



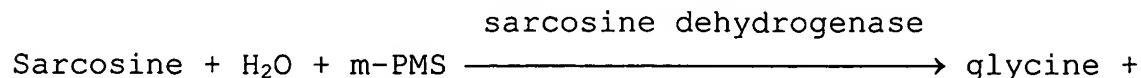
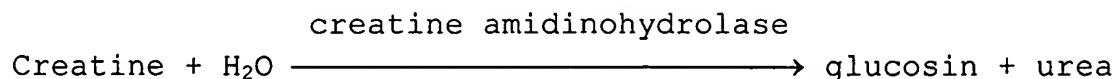
or



where O_2 indicates dissolved oxygen
and H_2O_2 indicates hydrogen peroxide.

This NAD(P)H reverts to NAD(P)^+ , and m-PMSH_2 reverts to m-PMS .
Thereafter, only water and oxygen are produced in the end if using
catalase, and only water is produced if using POD. Therefore, the
effect of the interfering substances is completely eliminated when
subsequently measuring the target component.

Specifically, after carrying out the elimination reactions, all
that need be added is ferric ammonium sulfonate, bathophenanthroline
sodium sulfonate, and the substrate of starch if measuring α -amylase,
lipase if measuring triglycerides, and L-asparaginic acid or L-
alanine and α -ketoglutarate if measuring GOT and GPT. When measuring
creatinine, intrinsic creatine produces m-PMSH_2 in the presence of p-
PMS through the following reactions.



formaldehyde + m-PSH₂

Thereafter, the reactions proceed in the same way using catalase or POD to eliminate the interfering substances. Next, adding creatinine amidohydrolase, ferric ammonium sulfonate, and bathophenanthroline sodium sulfonate can provide accurate measurement when measuring the target component.

In the detection systems (1) to (4) discussed above using nitrotetrazolium blue as a tetrazolium salt, intrinsic and extrinsic substances or their products which show an interfering effect during measurement reactions are oxidized in the presence of dehydrogenase to deactivate their interference capacity. NAD(P)⁺ is simultaneously reduced to produce NAD(P)H, then oxidized in the presence PMS or m-PMS to return to NAD(P)⁺. At the same time, PMS and m-PMS are reduced to produce PMSH₂ and m-PMSH₂. Dissolved oxygen in the reaction solution oxidizes these to return to the original PMS and m-PMS and simultaneously produces hydrogen peroxide, but this hydrogen peroxide is degraded and eliminated by the effect of catalase. When reacted in the presence of peroxidase (POD), dissolved oxygen oxidizes these to return to the original PMS and m-PMS and simultaneously produces water. The same reaction through PMS or m-PMS is required even when using an oxidoreductase which does not require a freed coenzyme.

After eliminating interfering substances in a specimen in this way, a component can be measured as discussed above with no residual effect, allowing accurate colorimetric assay by comparing the color

of the component to the color of the formazan or chelate compound in the final stage. Because a reducible colorant is present, PMSH₂ and m-PSMH₂ in the final stage quantitatively color the formazan or chelate compound instead of reacting with dissolved oxygen. The same reactions also occur when using diaphorase as an electron carrier, allowing different combinations of raw components.

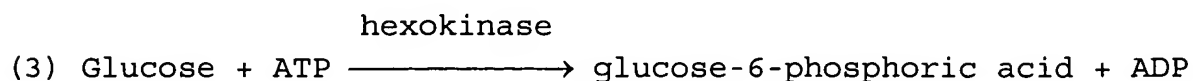
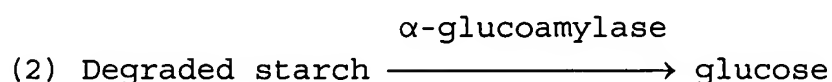
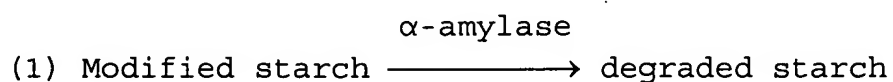
Thus, the method of the present invention applies an enzyme reaction to measure products produced quantitatively in succession from the target component using an electron carrier and a reducible colorant. This can be applied with marked effectiveness to measuring α -amylase, measuring triglycerides, and measuring triglycerides in a specimen solution using glycerin dehydrogenase or glycerokinase-glycerophosphate dehydrogenase. /533

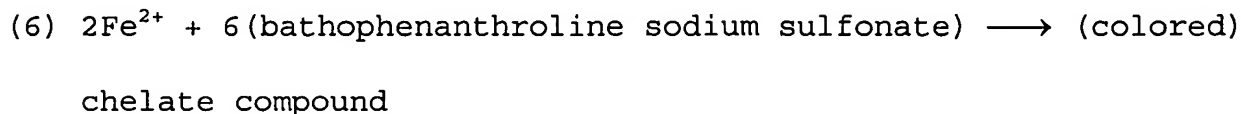
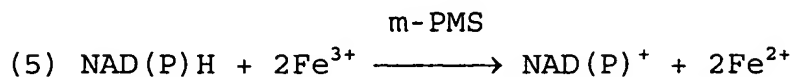
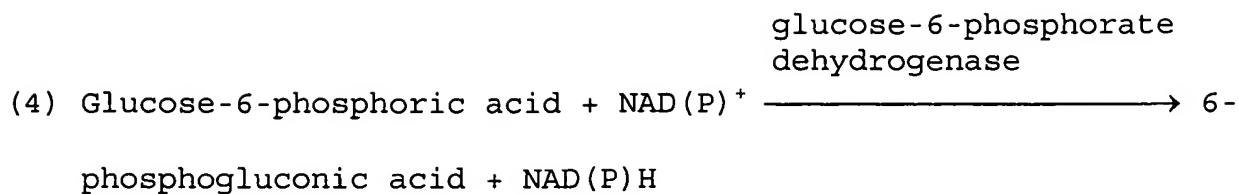
Next, the method of the present invention and its effects will be discussed in greater detail by working examples and test examples.

The elimination reactions are expressed as a pretreatment.

Working Example 1 Measurement of α -Amylase

The following reaction system can measure α -amylase in a specimen.



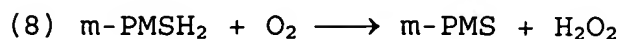


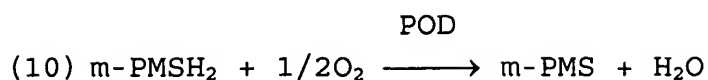
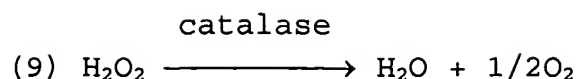
where ATP: adenosine triphosphate

ADP: adenosine diphosphate

The chelate compound produced by the reaction (6) is measured for absorptance, and α -amylase activity is calculated from the result. If the body fluid contains intrinsic glucose or the interfering substance of maltose, which is now commonly used as an import solution, the reaction (3) or the reactions (2) and (3) followed by the reactions (4), (5), and (6) produce a chelate compound, which produces an error when measuring α -amylase.

When reacted starting from the reaction (2) in the present invention without first adding modified starch in the reaction (1), the reactions (2), (3), and (4) convert intrinsic glucose and maltose to 6-phosphogluconic acid, which is eliminated. The next reactions (5) and (6) do not occur because there is no iron chelating agent, and the following reactions occur instead.





where O_2 : dissolved oxygen

H_2O_2 : hydrogen peroxide

The reactions (7) to (10) return the NAD(P)H produced by the interfering substances to NAD(P)⁺ and return m-PMSH₂ to m-PMS, finally producing only water and oxygen if using catalase and only water if using POD. Therefore, the interfering substances are eliminated and do not affect the subsequent component measurement. That is, carrying out the reactions from (1) through (6) after pretreating can accurately measure α-amylase.

1. Reagents

(1) 100 mmol/L Succinic buffer (pH 8.2) containing

ATP	5 mmol/L
NADP ⁺	0.4 mmol/L
m-PMS	30 μmol/L
MgCl ₂	2.0 mmol/L
Hexokinase	600 U/L
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	500 U/L
Glucoamylase	4800 U/L
POD	10,000 U/L
Bovine albumin	0.1%

(2) 200 mmol/L Triethanolamine buffer (pH 7.0) containing

Bathophenanthroline sodium sulfonate	10 mmol/L	
Sodium starch glycolate	7.2 mg/mL	
(3) 50 mmol/L Triethanolamine buffer (pH 6.6) containing		
Ferric ammonium sulfonate	1.25 mmol/L	
Citric acid	5 mmol/L	
(4) 0.1 mmol/L Triethanolamine buffer (pH 8.6) containing		
Oxalic acid	5.0 mmol/L	
EDTA-OH	4 mmol/L	/534

2. Operating Method

Twenty μL of a serum specimen were combined with 2 mL of the reagent (1) and kept at 37°C for five minutes, then combined with 1 mL of an equal mixture of the reagents (2) and (3) and kept at 37°C for five more minutes, then combined with 1 mL of the reagent (4) to terminate the reaction. Next, the specimen was measured for absorbance of the 535 nm wavelength. A separate specimen of known α -amylase activity was subjected to the same operations to create a calibration curve, and the α -amylase activity of the serum specimen was found from this calibration curve.

Test Example 1

(1) Effect of Glucose on α -Amylase Measurement

The method of Working Example 1 was used to measure serum specimens containing 200, 400, 600, 800, and 1000 mg/dL concentrations of glucose for absorbance. Identical specimens were measured separately by a method without the pretreatment of the

present invention; specifically, by combining 20 μ L of a serum specimen with a reagent mixture of 2 mL of the reagent (1) and 1 mL of an equal mixture of the reagents (2) and (3) and keeping at 37°C for five minutes, then combining with 1 mL of the reagent (4) to terminate the reaction, then measuring for absorptance. The following table gives the results.

Glucose: Pretreatment	0	200	400	600	800	1000
yes	0.500	1.135	1.846	2.485	2.882	3.090
no	0.183	0.188	0.183	0.181	0.192	0.184

This table shows that glucose had a fairly great effect when the pretreatment for intrinsic glucose was omitted, with the result that α -amylase activity could not be measured in any true sense. The present invention could accurately measure α -amylase activity unaffected by even a high concentration of 1000 mg/dL of glucose.

(2) Correlation of Concentration of α -Amylase Activity to Absorptance in the Present Invention

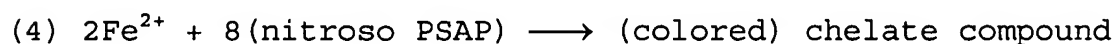
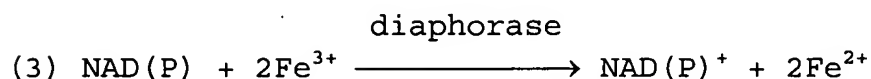
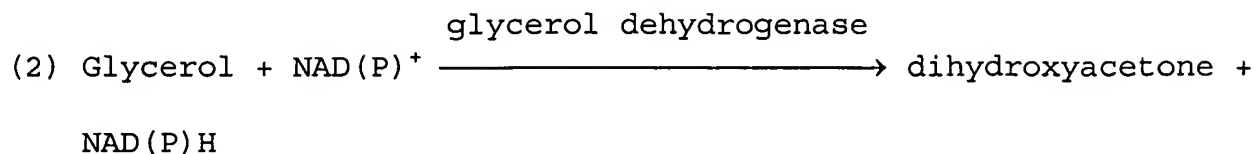
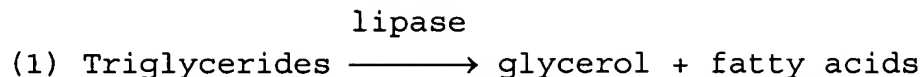
Fig. 1 shows results of measuring a series of concentrations of α -amylase activity for absorptance by the method of the present invention.

This graph shows a linear correlation between α -amylase activity and absorptance, demonstrating that α -amylase activity was measured accurately.

Working Example 2 Measurement of Triglycerides

The following reaction system can measure triglycerides in a

specimen.



The chelate compound produced by the reaction (6) is measured for absorptance, and triglycerides are calculated from the result.

If the body fluid contains intrinsic glycerol or the interfering substance of glycerol used by dialysis patients, this glycerol produces an error during measurement.

In the present invention, reacting glycerol first with glycerol dehydrogenase and NAD(P)^+ produces dihydroxyacetone, which is eliminated. Next, diaphorase and peroxidase eliminate the resulting NAD(P)H in the same way as the previous reaction, eliminating the interfering substance of glycerol.

Next, the specimen is combined with a reagent containing lipase and an iron chelating agent, which can accurately measure triglycerides.

1. Reagents

- (1) 100 mmol/L Triethanolamine buffer (pH 7.8) containing
 NAD^+ 40 mmol/L

Diaphorase	4000 U/L	
Peroxidase	80 mg/L	
Glycerol dehydrogenase	20,000 U/L	
Bovine albumin	1 g/L	
(2) 100 mmol/L Triethanolamine buffer (pH 7.8) containing		
Nitroso PSAP	10 mmol/L	/535
(3) 100 mmol/L Triethanolamine buffer (pH 7.2) containing		
Oxalic acid	20 mmol/L	
Ferric ammonium sulfate	10 mmol/L	
Lipase	4×10^5 U/L	
(4) 100 mmol/L Triethanolamine buffer (pH 8.6) containing		
EDTA-OH	4 mmol/L	

2. Operating Method

Five μ L of a serum specimen were combined with 500 μ L of the reagent (1) and kept at 37°C for ten minutes, then combined with 250 μ L of each of the reagents (2) and (3) and kept at 37°C for twenty more minutes, then combined with 4 mL of the reagent (4) to terminate the reaction. Next, the specimen was measured for absorptance of the 750 nm wavelength. A separate specimen of known glycerol content was subjected to the same operations to create a calibration curve, and triglycerides in the serum specimen were found from this calibration curve.

Test Example 2

(1) Effect of Glycerol on Triglyceride Measurement

The method of Working Example 2 was used to measure serum specimens containing 20, 40, 60, 80, and 100 mg/dL concentrations of glycerol for absorptance. Identical specimens were measured separately by a method without the pretreatment of the present invention; specifically, by combining 5 μ L of a serum specimen with a reagent mixture of 500 μ L of the reagent (1) and 250 μ L of each of the reagents (2) and (3) and keeping at 37°C for twenty minutes, then combining with 4 mL of the reagent (4) to terminate the reaction, then measuring for absorptance. The following table gives the results.

Glycerol: Pretreatment	0	20	40	60	80	100
yes	0.136	0.312	0.488	0.664	0.0840	1.016
no	0.130	0.135	0.133	0.131	0.139	0.130

This table shows that glycerol had a fairly great effect when the pretreatment for intrinsic glycerol was omitted.

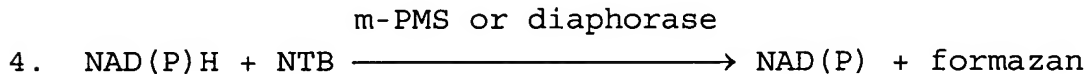
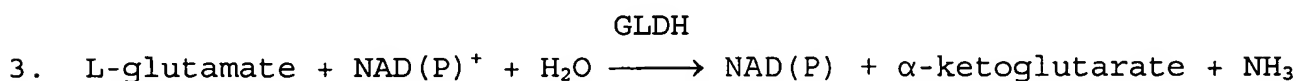
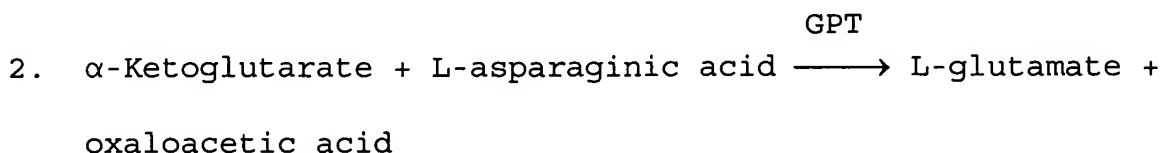
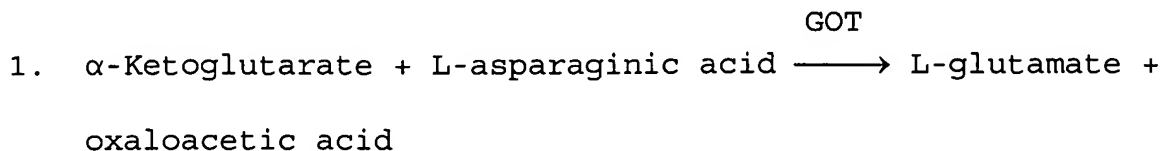
(2) Correlation of Concentration of Triglycerides to Absorptance in the Present Invention

Fig. 2 shows results of measuring a series of concentrations of triglycerides for absorptance by the method of the present invention. This graph shows a linear correlation between triglyceride concentration and absorptance, demonstrating that triglycerides were

measured accurately.

Working Example 3 Measurement of Glutamic-Oxaloacetic Transaminase
(GOT) and Glutamic-Pyruvic Transaminase (GPT)

The following reaction system can measure GOT and GPT in a specimen using glutamate dehydrogenase (GLDH).



The formazan produced by these reactions is measured for absorptance, and GOT and GPT activities are calculated from the result.

Any L-glutamate contained in serum or plasma as an interfering substance reacts with GLDH to produce NAD(P)H, producing an error in the measurement of GOT or GPT.

In the present invention, reacting first with GLDH and NAD(P)⁺ converts intrinsic L-glutamate to α-ketoglutarate, which is eliminated. Next, the resulting NAD(P)H is eliminated in the same way as in Working Example 1, eliminating the interfering substance of L-

glutamate.

Next, the specimen is combined with a reagent containing L-asparaginic acid or L-alanine, α -ketoglutarate, and NTB, which can accurately measure transaminase (GOT and GPT) activities.

1. Reagents

(1) 100 mmol/L Phosphoric buffer (pH 7.8) containing

Catalase	10,000 U/L
----------	------------

Glutamate dehydrogenase	40,000 U/L
-------------------------	------------

/536

NAD ⁺	46 mmol/L
------------------	-----------

m-PMS 100 μ mol/L or diaphorase	4000 U/L
-------------------------------------	----------

(2) For measuring GPT:

100 mmol/L Phosphoric buffer (pH 7.8) containing

DL-Alanine	800 mmol/L
------------	------------

α -Ketoglutarate	11 mmol/L
-------------------------	-----------

NTB	1.0 mmol/L
-----	------------

For measuring GOT:

100 mmol/L Phosphoric buffer (pH 7.8) containing

L-asparaginic acid	400 mmol/L
--------------------	------------

α -Ketoglutarate	16 mmol/L
-------------------------	-----------

NTB	1.0 mmol/L
-----	------------

(3) 0.1 N HCl solution containing 0.1% Triton X-100

2. Operating Method

Twenty μ L of a serum specimen were combined with 250 mL of the reagent (1) and kept at 37°C for ten minutes, then combined with 250

μL of the reagent (2) and kept at 37°C for thirty more minutes, then combined with 3 mL of the reagent (3) to terminate the reaction. Next, the specimen was measured for absorptance of the 560 nm wavelength.

Separate specimens of known GOT or GPT activity were subjected to the same operations to create calibration curves, and the GOT or GPT activity in the serum specimen was found from these calibration curves.

Test Example 3

(1) Effect of L-Glutamate on GOT and GPT Measurements

The method of Working Example 2 was used to measure serum specimens containing 20, 40, 60, 80, and 100 mg/dL concentrations of L-glutamate for absorptance. Identical specimens were measured separately by a method without the pretreatment of the present invention; that is, by combining 20 μL of a serum specimen with a reagent mixture of 250 mL of the reagent (1) and 250 μL of the reagent (2) and keeping at 37°C for thirty minutes, then combining with 3 mL of the reagent (3) to terminate the reaction, then measuring for absorptance. The following table gives the results.

L-Glutamate: Pretreatment		0	20	40	60	80	100
m-PMS	yes	0.060	0.073	0.084	0.105	0.124	0.150
	no	0.042	0.040	0.041	0.045	0.044	0.042
Diaphorase	yes	0.061	0.073	0.086	0.101	0.123	0.150
	no	0.041	0.040	0.042	0.046	0.043	0.042

This table shows that L-glutamate had a fairly great effect when the pretreatment for intrinsic L-glutamate was omitted, with the result that GOT and GPT activities could not be measured in any true sense. The present invention could accurately measure GOT and GPT activities with no effect by even a high concentration of 100 mg/dL of L-glutamate.

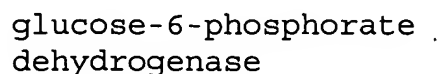
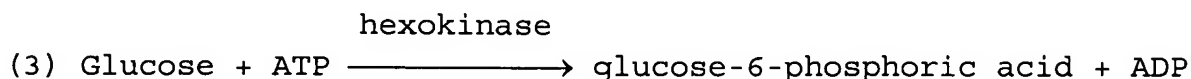
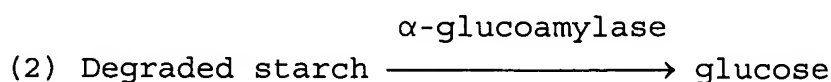
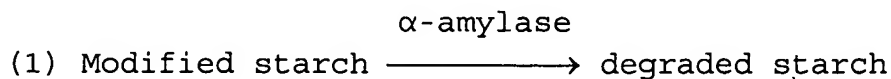
(2) Correlation of Concentration of GOT and GPT Activities to Absorptance in the Present Invention

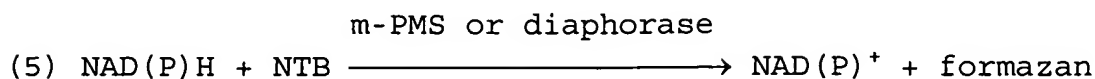
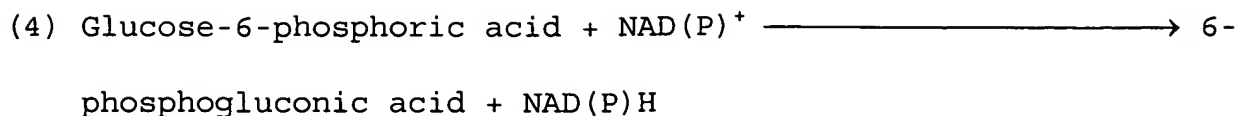
Fig. 3 shows results of measuring a series of concentrations of GOT and GPT activities for absorptance by the method of the present invention.

This graph shows a linear correlation between concentrations of GOT and GPT activities and absorptance, demonstrating that GOT and GPT were measured accurately.

Working Example 4 Measurement of α -Amylase

The following reaction system can measure α -amylase in a specimen.





where ATP: adenosine triphosphate

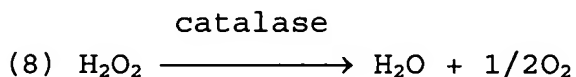
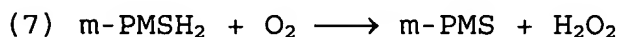
/537

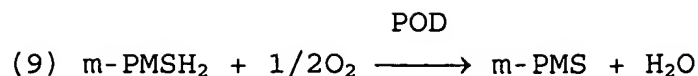
ADP: adenosine diphosphate

NTB: nitrotetrazolium blue (a tetrazolium compound)

The formazan produced by the reaction (5) is measured for absorptance, and α -amylase activity is calculated from the result. If the body fluid contains intrinsic glucose or the interfering substance of maltose, which is now commonly used as an import solution, the reaction (3) or the reactions (2) and (3) followed by the reactions (4) and (5) produce formazan, which produces an error when measuring α -amylase.

When reacted starting from the reaction (2) in the present invention without first adding modified starch in the reaction (1), the reactions (2), (3), and (4) convert intrinsic glucose and maltose into 6-phosphogluconic acid, which is eliminated. The next reaction (5) does not occur because there is no NTB, and the following reactions occur instead.

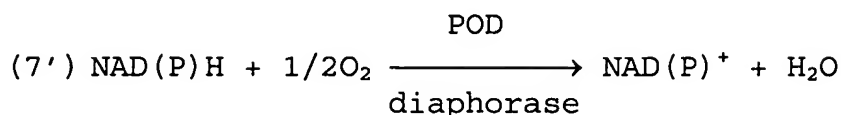
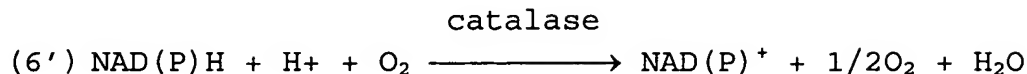




where O₂: dissolved oxygen

H₂O₂: hydrogen peroxide

or



The reactions (6) to (9) or (6') and (7') return the NAD(P)H produced by the interfering substances to NAD(P)⁺, finally producing only water and oxygen if using catalase and only water if using POD. Therefore, the interfering substances are eliminated and do not affect the subsequent component measurement. That is, carrying out the reactions from (1) through (5) after pretreating can accurately measure α-amylase.

1. Reagents

(1) 100 mmol/L Succinic buffer (pH 8.2) containing

ATP	5 mmol/L
NADP ⁺	0.4 mmol/L
m-PMS 30 μmol/L or diaphorase	2000 U/L
MgCl ₂	2.0 mmol/L
Hexokinase	600 U/L
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	500 U/L
Glucoamylase	4800 U/L

POD	10,000 U/L
Bovine albumin	0.1%
(2) 50 mmol/L Succinic buffer (pH 6.4) containing	
Triton X-100	3 mmol/L
Sodium starch glycolate	7.2 mg/mL
(3) 0.6 N HCl solution containing	
Triton X-100	0.33%
Citric acid	5 mmol/L

2. Operating Method

Twenty μ L of a serum specimen were combined with 2 mL of the reagent (1) and kept at 37°C for five minutes, then combined with 1 mL of the reagent (2) and kept at 37°C for five more minutes, then combined with 1 mL of the reagent (3) to terminate the reaction. Next, the specimen was measured for absorptance of the 600 nm wavelength. A separate specimen of known α -amylase activity was subjected to the same operations to create a calibration curve, and the α -amylase activity of the serum specimen was found from this calibration curve.

Test Example 4

(1) Effect of Glucose on α -Amylase Measurement

The method of Working Example 1 was used to measure serum specimens containing 200, 400, 600, 800, and 1000 mg/dL concentrations of glucose for absorptance. Identical specimens were measured separately by a method without the pretreatment of the

present invention; that is, by combining 20 μ L of a serum specimen with a reagent mixture of 2 mL of the reagent (1) and 1 mL of an equal mixture of the reagents (2) and (3) and keeping at 37°C for five minutes, then combining with 1 mL of the reagent (4) to terminate the reaction, then measuring for absorptance. The following /538 table gives the results.

Glucose: Pretreatment		0	200	400	600	800	1000
m-PMS	yes	0.410	0.930	1.513	2.037	2.362	2.533
	no	0.150	0.154	0.150	0.148	0.157	0.151
Diaphorase	yes	0.411	0.932	1.508	2.034	2.370	2.540
	no	0.149	0.155	0.152	0.148	0.151	0.157

This table shows that glucose had a fairly great effect when the pretreatment for intrinsic glucose was omitted, with the result that α -amylase activity could not be measured in any true sense. The present invention could accurately measure α -amylase activity with no effect by even a high concentration of 1000 mg/dL of glucose.

(2) Correlation of Concentration of α -Amylase Activity to Absorptance in the Present Invention

Fig. 4 shows results of measuring a series of concentrations of α -amylase activity for absorptance by the method of the present invention.

This graph shows a linear correlation between α -amylase activity and absorptance, demonstrating that α -amylase activity was measured accurately.

As discussed above, the method of the present invention is very useful on the point of eliminating interfering substances in a specimen to enable accurate measurement without wasting reagents.

4. BRIEF EXPLANATION OF THE DRAWINGS

Figs. 1 to 4 show absorptance on the horizontal axis and serum dilutions on the vertical axis.

The ● symbol in Fig. 1 shows α -amylase activity in serum. The ● symbol in Fig. 2 shows triglyceride concentration. The O symbol in Fig. 3 shows GOT activity, and the Δ symbol shows GPT activity.

The O symbol in Fig. 3 shows α -amylase activity in serum. The O symbol in Fig. 2 shows GOT activity, and the Δ symbol shows GPT activity. The O symbol in Fig. 4 shows α -amylase activity.

FIG. 1

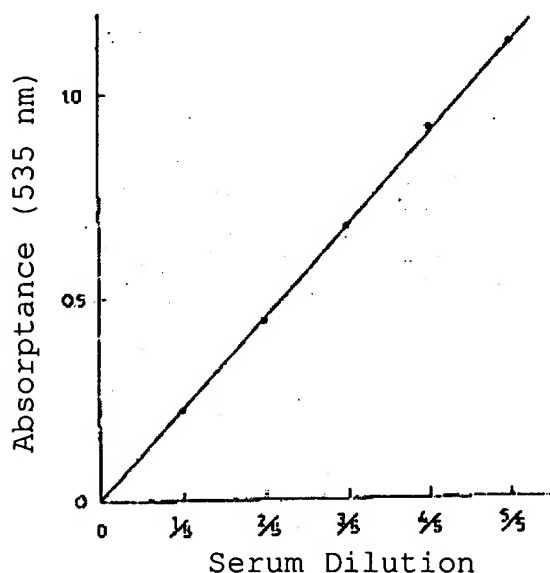


FIG. 2

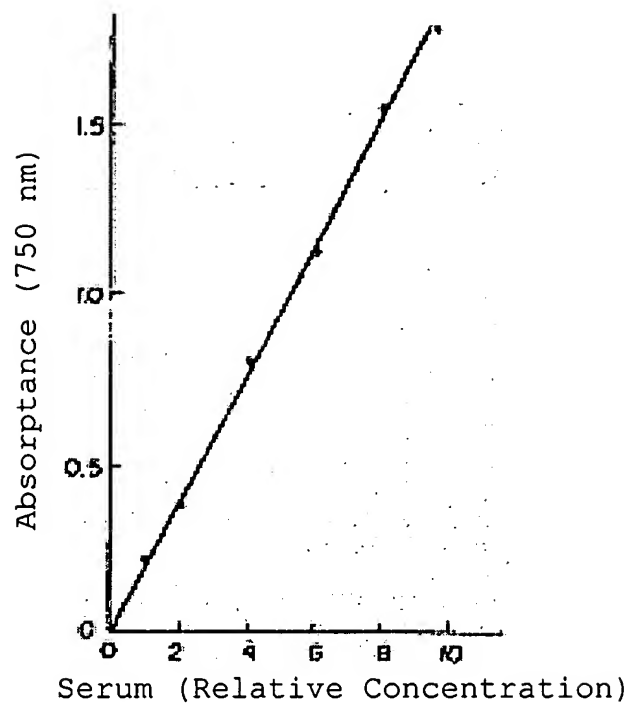


FIG. 3

/539

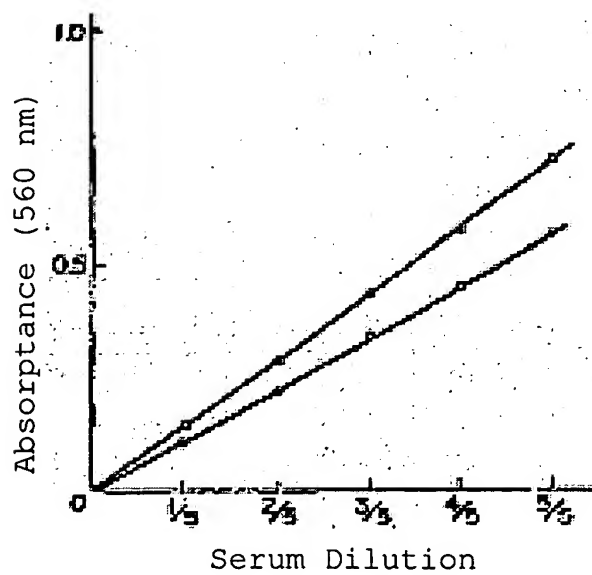


FIG. 4

